

云南小耳猪胰岛细胞肝内移植对糖尿病猴的治疗作用

刘萍¹⁾, 李汝红²⁾, 侯宗柳³⁾, 李鹏²⁾, 和占龙⁴⁾, 王殿华¹⁾

(1) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650031; 2) 昆明市延安医院普外科, 云南昆明 650051; 3) 昆明市延安医院中心实验室, 云南昆明 650051; 4) 中国医学科学院生物研究所, 云南昆明 650106)

[摘要] **目的** 探讨云南小耳猪胰岛细胞经门静脉肝内异种移植的可行性, 观察其对恒河猴糖尿病的治疗作用。 **方法** STZ 诱导法复制恒河猴糖尿病模型, 经胃网膜右静脉输注分离纯化的云南小耳猪胰岛细胞, 移植在糖尿病猴肝内, 移植后使用小剂量无激素免疫抑制方案, 监测移植前后胰岛素用量、血糖以及血清 C 肽水平和肝肾功能的变化, 评价猪-猴异种胰岛细胞移植对恒河猴糖尿病的治疗作用。 **结果** STZ 能成功诱导恒河猴糖尿病模型; 移植后第 3 天实验组糖化血红蛋白较术前降低, 而对照组糖化血红蛋白一直呈上升状态; 实验组外源性胰岛素用量较术前明显减少 ($P < 0.05$), 对照组胰岛素用量无明显变化; 实验组 C 肽水平较术前升高 ($P < 0.05$), 对照组 C 肽一直维持在较低水平; 无栓塞、感染、出血, 肝肾功能无明显异常改变。 **结论** 云南小耳猪-恒河猴异种胰岛细胞移植能够降低糖尿病猴的高血糖状态, 改善糖尿病症状, 无明显副作用。

[关键词] 糖尿病; 猪; 胰岛细胞; 异种移植

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 03-0013-05

The Treatment Effect of Intrahepatic Islets Xenotransplantation of Yunnan Miniature Pig to Diabetes Rhesus Monkey

LIU Ping¹⁾, LI Ru-hong²⁾, HOU Zong-liu³⁾, LI Peng²⁾, HE Zhan-long⁴⁾, WANG Dian-hua¹⁾

(1) Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 2) Dept. of General Surgery, Kunming Yan'an Hospital, Kunming Yunnan 650051; 3) Center Laboratory, Kunming Yunnan 650051; 4) Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To explore the treatment effect of intrahepatic islets xenotransplantation of yunnan miniature pig to diabetes Rhesus monkey. **Methods** Rhesus monkeys were induced by streptozotocin (STZ), then were perfused with purified porcine islets through the right gastroepiploic vein. Small dose immunosuppressive regimen without hormone was used. The dose of insulin, glycated hemoglobin, C peptide, blood glucose level, and function of livers and kidneys of Rhesus monkeys were measured before and after transplantation. **Results** Type 1 diabetic Rhesus monkeys were successfully induced by STZ. The glycosylated hemoglobin in experimental group was decreased on the third day after transplantation, while the glycosylated hemoglobin in control group showed a rising state. The dose of insulin in experimental group was decreased significantly compared with pretransplantation ($P < 0.05$), while the dose of insulin in control group had no obvious change. The serum C peptide levels in experimental group were elevated compared with preoperative levels ($P < 0.05$), but the serum C peptide in control group was maintained at a low level. Embolism, infection and hemorrhage was not found. The

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2008CD049)

[作者简介] 刘萍 (1985~), 女, 湖北孝感市人, 在读硕士研究生, 主要从事病理生理学研究。李汝红与刘萍对本文有同等贡献。

[通讯作者] 王殿华. E-mail: wangdianhuakm@126.com.

function of livers and kidneys was maintained normal. **Conclusion** The intrahepatic islets xenotransplantation through the right gastroepiploic vein can decrease the high plasma glucose level of diabetic Rhesus monkeys, improve the symptoms of diabetes, and not lead to adverse reaction.

[**Key words**] Diabetes mellitus; Pig; Islet cells; Xenotransplantation

1 型糖尿病 (insulin-dependent diabetes melitus, IDDM) 是以破坏 B 细胞为主的自身免疫性疾病, 胰岛细胞移植重建胰岛的分泌系统, 已被确认是唯一一种彻底根治糖尿病的方法^[1]. 同种供体的匮乏导致异种移植研究成为热点, 猪又以其诸多优势位居胰岛移植供体来源的榜首. 本研究选用云南小耳猪作为异种胰岛细胞移植供体, 肝内移植配合使用免疫抑制剂, 观察糖尿病猴移植胰岛细胞后的疗效, 旨在为异种胰岛细胞移植根治糖尿病提供实验理论和依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性恒河猴 6.0 ~ 6.4 kg, 5 岁, 由中国医学科学院医学生物研究所提供. 实验处理符合动物伦理学标准.

1.2 恒河猴糖尿病模型复制

猴禁食 16 h, 肌注速眠新 II 注射液 0.1 mL/kg 麻醉后, 猴静脉内缓慢推注 50 mg/kg 新鲜配置的链脲菌素 (STZ), 复制糖尿病模型. 评价标准: 出现典型糖尿病症状 (多尿、多饮和不能解释的体重下降)、任意血糖 ≥ 11.1 mmol/L 或空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 并持续 2 周. 适当补充外源性胰岛素 (0.4 U/kg) 或 50% 葡萄糖.

1.3 云南小耳猪胰岛细胞制备

半自动纯化法分离纯化成年云南小耳猪胰岛细胞, AO-PI 活性鉴定猪胰岛细胞活性, 制备细胞悬液备用.

1.4 猪-猴异种胰岛细胞移植

实验分为 2 组: 对照组, 仅用胰岛素控制血糖在 5 ~ 10 mmol/L; 实验组, 糖尿病猴接受猪胰岛细胞移植, 术后免疫抑制方案维持, 酌情使用胰岛素, 血糖控制在 5 ~ 10 mmol/L. 异种胰岛细胞移植: 糖尿病猴麻醉后经胃网膜右静脉将猪胰岛细胞悬液 50 mL 输注到肝脏, 同时输注肝素 100 U/kg 和头孢美唑 100 mg/kg, 严密观察猴状态及生命体征.

1.5 术后免疫抑制方案

移植术后给予无激素免疫抑制剂, 方案: 西罗莫司: 晨空腹 6 mL, 血药浓度维持于 9 ~ 12

ng/mL; 他可莫司: 早晚各 1.5 mg, 血药浓度维持在 4 ~ 6 ng/mL; 吗替麦考酚酯: 早晚各 625 mg.

1.6 各项指标的检测

严密监测动物的饮食、二便、活动、精神状态及体重变化. 测定血糖、尿糖、血常规、血生化、血清糖化血红蛋白和 C 肽水平.

1.7 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 糖尿病恒河猴糖耐量、血糖、尿糖的变化

糖耐量试验 (OGTT) 结果显示, STZ 诱导前恒河猴 OGTT 未见明显异常变化, 见图 1.

STZ 诱导后恒河猴血糖水平: 2 组猴给药 8 h 后, 血糖水平均开始升高, 17 h、30 h、48 h 的血糖保持在高水平, 见表 1、表 2. STZ 诱导后恒河猴尿糖水平: 2 组猴给药 8 h 后, 尿糖阳性, 17 h、30 h、48 h 的尿糖保持在强阳性, 见表 2. STZ 诱导 48 h 后 2 组随机 2 次餐后血糖均 > 11.1 mmol/L, 酌情肌注胰岛素可使血糖水平保持 < 11.1 mmol/L, 均出现多尿、多饮、体重下降的典型糖尿病症状, 并能持续 2 周, 符合实验性猴糖尿病模型标准.

2.2 小耳猪胰岛细胞活性及收获量

云南小耳猪分离纯化后获取的胰岛细胞团数量为 $(3\ 192 \pm 756)$ IEQ/胰腺组织 g, 活细胞率为 $(80.00 \pm 0.47)\%$, 输注胰岛细胞量为 9 355 IEQ/体重 kg.

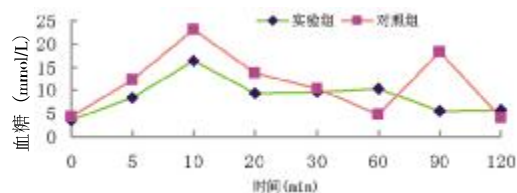


图 1 STZ 诱导前恒河猴口服糖耐量试验

Fig. 1 Oral glucose tolerance test in Rhesus monkey before STZ induction

表 1 STZ 诱导后恒河猴血糖水平 (mmol/L)
Tab. 1 The blood glucose levels of Rhesus monkeys after STZ induction (mmol/L)

组 别	0 h	8 h	17 h	30 h	48 h
实验组	4.8	9.0	15.4	14.2	15.0
对照组	4.9	9.5	16.2	16.1	15.5

表 2 STZ 诱导后恒河猴尿糖水平
Tab. 2 The urine glucose levels of in Rhesus monkeys after STZ induction

组 别	0 h	8 h	17 h	30 h	48 h
实验组	—	±	+++	++++	++++
对照组	—	±	++	++++	++++

2.3 猪 – 猴异种胰岛细胞移植前后猴的糖尿病症状

移植前糖尿病猴表现有多饮、多尿、多食、体重下降典型的糖尿病症状，体重较前平均下降 20%。移植后猴的糖尿病症状逐渐减轻，体重逐渐恢复到术前水平。

2.4 猪 – 猴异种胰岛细胞移植前后猴的糖化血红蛋白、C 肽水平和胰岛素使用量

移植术后第 3 天，实验组猴的血清糖化血红蛋白水平较术前降低，而对照组猴的血清糖化血红蛋白水平呈上升状态，见图 2。实验组猴的血清 C 肽水平较术前升高 ($P < 0.05$)，对照组猴的血清 C 肽水平维持在较低水平，见表 3。实验组猴的外源性胰岛素用量较术前明显减少 ($P < 0.05$)，对照组猴的胰岛素用量无明显改变，见表 4。

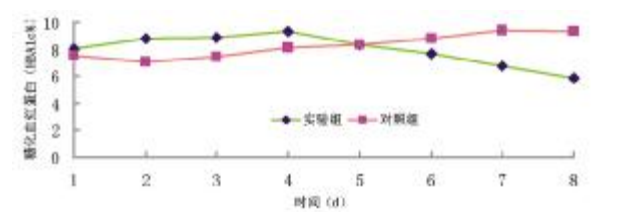


图 2 异种胰岛移植后糖尿病猴的糖化血红蛋白水平比较
Fig. 2 Comparison of glycosylated hemoglobin level on diabetic Rhesus monkeys after islet xenotransplantation between two groups

表 3 异种移植术前后糖尿病猴的血清 C 肽水平对比
[$(\bar{x} \pm s)$, U]
Tab. 3 Comparison of serum C peptide on diabetic Rhesus monkeys between before and after islet xenotransplantation [$(\bar{x} \pm s)$, U]

组 别	移植术前	移植术后
实验组	0.34 ± 0.03	$2.46 \pm 0.20^*$
对照组	0.86 ± 0.19	0.54 ± 0.18

与移植前相比, $^*P < 0.05$.

表 4 异种移植术前后糖尿病猴的外源性胰岛素用量对比
[$(\bar{x} \pm s)$, U]

Tab. 4 Comparison of exogenous insulin dosage used on diabetic Rhesus monkeys before and after islet xenotransplantation [$(\bar{x} \pm s)$, U]

组 别	移植术前 (U)	移植术后 (U)
实验组	4.0 ± 0.2	$1.3 \pm 0.1^*$
对照组	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.2

与移植前相比, $^*P < 0.05$.

2.5 猪 – 猴异种胰岛细胞移植前后猴的肝肾功能

实验猴接受移植手术后第 1 天即给予免疫抑制治疗，西罗莫司血药浓度控制在 9 ng/mL，他可莫司血药浓度控制在 6 ng/mL；吗替麦考酚酯每天 1.25 g，2 组猴均未发生药物过敏及肝肾等功能损害，肝肾功能各项主要指标均在正常范围 ($P > 0.05$)，见表 5。

表 5 异种移植术前后糖尿病猴肝肾功能
[$(\bar{x} \pm s)$]
Tab. 5 Liver and kidney function in diabetic rhesus before and after islet xenotransplantation [$(\bar{x} \pm s)$]

指 标	移植术前	移植术后
ALT (U/L)	57.68 ± 14.63	77.5 ± 12.02
AST (U/L)	75.36 ± 20.19	85.33 ± 15.56
GGT (U/L)	55.73 ± 10.01	57.52 ± 9.71
ALP (U/L)	553.5 ± 111.35	466.58 ± 34.65
BUN (mmol/L)	7.53 ± 1.09	5.94 ± 1.05
Gr (mmol/L)	49.33 ± 9.22	48.63 ± 1.41
UA (mmol/L)	50.88 ± 15.11	39.23 ± 9.93

2.6 猪 – 猴异种胰岛细胞移植前后猴的感染及血栓栓塞

糖尿病猴移植术中输注肝素 550 U，术后再连

续 3 d 使用 550 U/d, 未发生血栓栓塞。糖尿病猴术前术中术后连续 4 d 使用头孢美唑 0.55 g/d, 未发生感染症状, 血常规也提示未见明显感染迹象 ($P>0.05$), 见表 6。

表 6 异种移植术前糖尿病猴血常规 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Blood routine findings in diabetic Rhesus monkeys before and after islet xenotransplantation ($\bar{x} \pm s$)

项 目	WBC ($10^9/L$)	NEUTRO (%)	RBC ($10^{12}/L$)	HGB (g/L)	PLT ($10^9/L$)
移植术前	8.71 $\pm$ 1.13	51.53 $\pm$ 6.32	5.15 $\pm$ 0.13	129.5 $\pm$ 8.70	446.3 $\pm$ 90.2
移植术后	8.69 $\pm$ 1.26	71.40 $\pm$ 8.35	5.03 $\pm$ 0.13	125.75 $\pm$ 4.03	462.75 $\pm$ 46.46

3 讨论

IDDM 是一种以破坏 B 细胞为主的自身免疫性疾病, 注射胰岛素是控制患者血糖的有效手段, 但外源性胰岛素不能达到生理性调节血糖的目的, 不能防止或延缓糖尿病并发症的发生, 患者生活质量降低, 甚至危及生命。因此寻求根治糖尿病的治疗方法是目前医学研究的重点和难点。

大量临床前研究已经宣告胰岛移植是 IDDM 理想的治疗方法, 同种移植因为供体来源匮乏而受阻, 异种移植成为研究焦点。猪、牛、犬、猴等都可作为异种胰岛移植的供体, 猪以其诸多优点脱颖而出: 猪胰岛素与人胰岛素结构仅有 1 个氨基酸差异、生理血糖调定点相近; 猪胰岛在含人新鲜血清的培养基中能很好地存活与增生; 并且猪的饲养成本低、繁殖快、成熟期短、产仔多, 是一种极为经济和方便的胰岛细胞供体, 可提供足够数量的胰岛; 猪与人之间没有严重的人畜共患病^[2]。新生猪和成猪胰岛细胞移植入糖尿病动物模型治疗糖尿病均有报道^[3], 相较而言, 成猪胰岛细胞在移植后几小时就可以逆转高血糖症状, 能更好发挥效能^[4]。因此本研究选用云南成年小耳猪, 因其品系纯正且云南特有, 已广泛用于临床前研究, 是一种理想的异种移植供体。

为了实现猪胰岛细胞移植到患者体内治疗糖尿病的目的, 选择与人类最为接近的物种作为受体进行临床前研究尤为重要。猴是非常合适的异种胰岛移植受体, 它们不仅可以通过 STZ 药物诱导为糖尿病, 更为重要的, 诱导出来的糖尿病症状可以通过注射外源性胰岛素得到良好的控制并持续很长时间^[5-7]。本研究也证实给予 STZ 后能够成功诱导猴糖尿病, 使用胰岛素血糖能很好地控制在 <11.1 mmol/L 而且没有出现糖尿病相关并发症。

肝内胰岛移植具有操作相对简单安全、不改变正常的胰岛素释放途径、有利于移植血管神经的恢复、能避免排斥反应等优点^[6], 是较理想的胰岛移植部位。肝内胰岛移植常用的途径主要有经门静

脉、肝动脉等方法。经门静脉途径胰岛移植占近几年国内外移植病例的 80% 以上。本研究采用了开腹经胃网膜右静脉置管入门静脉借助重力输注小耳猪胰岛细胞悬液的方法, 协同输注肝素抗凝, 头孢美唑预防感染, 术中术后未发生血栓栓塞、感染、出血等症状, 提示经门静脉肝内移植是一种异种胰岛移植安全有效的途径。

临床开展的胰岛细胞移植, 大多数病人需要 $>10\ 000$ IEQ/kg 才能达到理想的胰岛素水平。胰岛移植需要控制胰岛细胞数量, 主要是避免门脉栓塞, 通常是胰岛混同肝素一起移植, 通过这种方式安全无并发症的最大胰岛移植量为 $32\ 000$ IEQ/kg^[7]。Edmonton 方案建议移植 $11\ 000$ IEQ/kg 的胰岛, 该实验室报道 (2002 年) 30 名糖尿病患者按 $9\ 000$ IEQ/kg 进行了胰岛移植, 效果良好。本研究实验组输注了 $9\ 355$ IEQ/kg, 协同肝素 550 U, 糖化血红蛋白较术前降低, C 肽水平较术前升高 ($P<0.05$), 外源性胰岛素用量较术前明显减少 ($P<0.05$), 提示猪胰岛细胞在糖尿病猴体内发挥了作用。这为云南小耳猪胰岛细胞异种移植治疗人糖尿病的可能性提供了初步的实验依据。

猪-猴的异种移植模式, 必然涉及到免疫排斥, 因而探讨一种良好的免疫抑制方案在异种胰岛移植甚为关键^[8]。本研究根据文献^[9]、Edmonton 方案^[10]、临床经验和免疫药物等设计出小剂量无激素免疫抑制方案, 该方案的使用未发生实验猴药物过敏及肝肾等功能损害, 糖化血红蛋白、C 肽水平和胰岛素用量监测结果显示猪胰岛细胞在糖尿病猴体内存活并发挥作用。这些结果提示本研究的免疫抑制方案在猪-猴异种胰岛细胞移植中安全有效。

目前异种胰岛移植仍处于试验研究阶段, 制定一个能够运用于临床、安全稳定、简单有效的免疫抑制方案, 进一步观察异种胰岛细胞移植的远期治疗效果、防止糖尿病并发症的发生发展等难题, 是本课题组努力工作的方向。希望在不久的将来, 异种胰岛细胞移植能够运用于临床造福

广大糖尿病患者.

[参考文献]

- [1] SHAPIRO A M, LAKEY J R, RYAN E A, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343 (4): 230 – 238.
- [2] ROOD PPM, BUHLER L H, BOTTINO R, et al. Pigto nonhuman primate islet xeno transplantation: a review of current problems [J]. *Cell Transplantation*, 2006, 15: 89 – 104.
- [3] HERING B J, WIJKSTROM M, GRAHAM M L, et al. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates [J]. *Nat Med*, 2006, 12: 301 – 303.
- [4] DAVALLI A M, BERTUZZI F, SOCCIC, et al. Paradoxical release of insulin by adult pig islets in vitro. recovery after culture in a dened tissue culture medium [J]. *Transplantation*, 1993, 56: 148 – 154.
- [5] CARDONA K, KORBUTT G S, MILAS Z, et al. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways [J]. *Nat Med*, 2006, 2: 304 – 306.
- [6] GABER A O, CHAMSUDDIN A, FRAGA D, et al. Insulin independence achieved using the transmesenteric approach to the portal vein for islet Transplantation [J]. *Transplantation*, 2004, 77 (2): 3 092 – 3 111.
- [7] BUHLER L, DENG S, NEIL J, et al. Adult porcine islet transplantation in baboons treated with conventional immunosuppression or a nonmyeloablative regimen and CD154 blockade [J]. *Xenotransplantation*, 2002, 9: 3 – 13.
- [8] CASU A, OTTINO R, BALAMURUGAN A N, et al. Metabolic aspects of pigto monk (macaca fascicularis) islet transplantation: implications for translation into clinical practice [J]. *Diabetologia*, 2008, 51: 120 – 129.
- [9] PLEUNIE P M, RITA B, BALAMURUGAN A N, et al. Reduction of early graft loss after intraportal porcine islet transplantation in monkeys [J]. *Transplantation*, 2007, 8 (2): 202 – 210.
- [10] SHAPIRO A M, RICORDI C, HERING B J, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355: 1 318 – 1 330.

(2012 – 01 – 23 收稿)